

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-507125

(43) 公表日 平成11年(1999) 6月22日

(51) IntCl. <sup>*</sup>	識別記号	F I	
G 0 1 N 33/543	5 2 1	G 0 1 N 33/543	5 2 1
	5 1 1		5 1 1 A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願平8-536564  
 (86) (22) 出願日 平成8年(1996) 5月23日  
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 12月2日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US96/07576  
 (87) 国際公開番号 WO96/38720  
 (87) 国際公開日 平成8年(1996) 12月5日  
 (31) 優先権主張番号 08/459, 466  
 (32) 優先日 1995年6月2日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, CN, JP

(71) 出願人 スミスクライン ダイアグノスティクス  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 95134 カリフォルニア  
 州 サンノゼ ベイポイント パークウェイ  
 エイ 225  
 (72) 発明者 チャンドラ、ハワード エム  
 アメリカ合衆国 04096 メイン州 ヤー  
 マス プリンシズ ポイント ロード 76  
 エイ  
 (74) 代理人 弁理士 松永 直行

(54) 【発明の名称】 競合イムノアッセイ装置

(57) 【要約】

競合イムノアッセイにおいて被検体を検出及び/又は測定するためのクロマトグラフアッセイ装置は、単一のアッセイ装置で被検体濃度について半定量的又は定量的の表示を与え、また流れが該装置中で適切に生じているという陽性表示も与える。一つの態様において、該装置は、試料調製帯域(18)と吸収剤(20)とを含む第一の対向させ得る構成部品(12)と；捕集帯域と検出帯域とを有する第一のクロマトグラフ媒体(22)、比較帯域(38)を有する第二のクロマトグラフ媒体(32)及び比較標識帯域(40)を含む第二の対向させ得る構成部品(14)とを含んでなる。

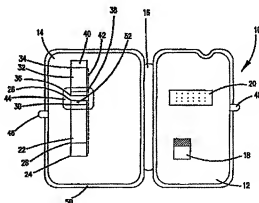


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

1. 競合イムノアッセイ装置であって、

(a)(i)補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーを溶解可能な形で含む試料調製帯域、及び

(ii) 前記第一の対向させ得る構成部品上の前記試料調製帯域から離れた吸収剤であって、その中に流体を吸収するための吸収剤を含んでなる第一の対向させ得る構成部品、並びに

(b)(i)第一と第二の端部を有する第一のクロマトグラフ媒体であって、該媒体上に下記の2つの帯域：

(A) 第一のクロマトグラフ媒体に結合されている固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域、及び

(B) 第一のクロマトグラフ媒体に結合されている第一のメンバーに特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーである固定化分子の第二の帯域

を含む第一のクロマトグラフ媒体と、

(ii) 第一と第二の端部を有する第二のクロマトグラフ媒体であって、該媒体上に比較帯域を含み、該比較帯域がそれに固定化された既知量の被検体又はその類縁体を含むものである第二のクロマトグラフ媒体と、

(iii)比較標識帯域であって、その中に被検体またはその類縁体に対する標識された特異結合パートナーを前記第二のクロマトグラフ媒体と操作可能な接触をし溶解可能な形で含む比較標識帯域とを含む、前記第一の対向させ得る構成部品に媒着し得る第二の対向させ得る構成部品

を具備してなり、

前記第一の対向させ得る構成部品と、前記第二の対向させ得る構成部品とを、これら構成部品同士が対向していない位置から対向した状態にした場合に、前記試料調製帯域が前記第一のクロマトグラフ媒体の第一の端部と操作可能な接触をして、試料と、前記の補助特異結合対の第一のメンバーに結合された被検体用の標識された特異結合パートナーとが前記第一のクロマトグラフ媒体に加えられ、か

つ前記吸収剤が前記第一のクロマトグラフ媒体の第二の端部及び前記第二のクロマトグラフ媒体の第二の端部と操作可能な接触をして、流体を前記第一のクロマトグラフ媒体及び前記第二のクロマトグラフ媒体を通してこれら2つのクロマトグラフ媒体のそれぞれの第一の端部からそれぞれの第二の端部に引き寄せ、それによって前記装置が被検体の存在について検出可能な競合表示を与えるものである、競合イムノアッセイ装置。

2. 第一の対向させ得る構成部品上の試料調製帯域がさらに第二の標識された特異結合パートナーであって被検体と実質的に架橋反応しない分子を結合する第二の標識された特異結合パートナーを溶解可能な形で含み、かつ第一のクロマトグラフ媒体がさらに流れ調節指示剤を含み、該流れ調節指示剤は前記第二の標識された特異結合パートナーを結合する分子を含むものであり、それによって該流れ調節指示剤が、流れが前記第一のクロマトグラフ媒体を通して生じているという陽性表示を与えるものである、請求項1記載のイムノアッセイ装置。

3. 補助特異結合対の第一のメンバーがビオチンである請求項1記載のイムノアッセイ装置。

4. 補助特異結合対の第二のメンバーがストレプトアビジンである請求項3記載のイムノアッセイ装置。

5. 被検体、固定された被検体又はその類縁体の第一の帯域、及びビオチンに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーのそれぞれが下記の組み合わせ：

(1)被検体が $\beta$ -ラクタム系抗生物質であり、前記の固定された被検体又はその類縁体の第一の帯域が免疫グロブリンに結合された7-アミノセファロスポラン酸であり、またビオチンに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーがビオチン化ペニシリン結合性タンパク質である、及び

(2)被検体がゲンタマイシン、スルファメタジン及びテトラサイクリンからなる群から選択される抗生物質であり、前記の固定された被検体又はその類縁体の第一の帯域が免疫グロブリンに共有結合された被検体であり、またビオチンに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーがビオチン化抗-被検体抗体

である組み合わせからなる群から選択される、請求項4記載のイムノアッセイ装置。

6. 被検体の検出及び／又は測定用の試験キットであって、別々の容器に包装され、

(a) 請求項1記載のイムノアッセイ装置と、

(b) 前記の比較標識帯域において前記の被検体又はその類縁体に対する標識された特異結合パートナーを溶解するための液体とを含む、被検体の検出及び／又は測定用の試験キット。

7. 競合イムノアッセイ装置であって、

(a) (i) (A) 溶解可能な形の、補助特異結合対の第一のメンバーに

結合された被検体用の標識された特異結合パートナーと、

(B) 溶解可能な形の、被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーに共有結合された所定量の被検体又はその類縁体を含む試料調製帯域、及び

(ii) 前記試料調製帯域から離れた吸収剤を含んでなる第一の対向させ得る構成部品、並びに

(b) クロマトグラフ媒体の上に別個に下記を重ねていない帯域：

(i) クロマトグラフ媒体に結合された固定化被検体又はその類縁体の第一の、捕集帯域と、

(ii) クロマトグラフ媒体に結合されている第一のメンバーに特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーである固定化分子を含む第二の、検出帯域と、

(iii) クロマトグラフ媒体に結合された被検体又はその類縁体に共有結合されかつ標識された特異結合パートナーに特異的に結合され得る固定化分子を含む第三の、対照帯域と

を含む、第一と第二の端部を有するクロマトグラフ媒体を含んでなる、第二の対向させ得る構成部品

を具備してなり、

前記第一の対向させ得る構成部品と前記第二の対向させ得る構成部品とを、これらが対向していない位置から対向した状態にした場合に、前記吸収剤が前記クロマトグラフ媒体の第二の端部と操作可能な接触をしかつ前記試料調製帯域が前記クロマトグラフ媒体の第一の端部と接触して、試験試料と、ビオチンに結合された被検体用の

溶解され標識された特異結合パートナーと、標識された特異結合パートナーに共有結合している所定量の被検体又はその類縁体とが第一の端部から第二の端部に前記クロマトグラフ媒体を通じて流れ、それによって前記装置が被検体の存在について検出可能な競合表示を与えるように、前記第一の対向させ得る構成部品と前記第二の対向させ得る構成部品とが配置される、競合イムノアッセイ装置。

8. 前記の補助特異結合対の第一のメンバーがビオチンである請求項7記載のイムノアッセイ装置。

9. 前記の補助特異結合対の第二のメンバーがストレプトアビジンである請求項8記載のイムノアッセイ装置。

10. 被検体、ビオチンに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナー、クロマトグラフ媒体上の捕集帯域で結合されている固定化された被検体又はその類縁体、被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナー、及びクロマトグラフ媒体上の対照帯域で結合される固定化分子、のそれぞれが下記の組み合わせ：

(1) 被検体が $\beta$ -ラクタム系抗生物質であり、ビオチンに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーがビオチン化ペニシリン結合性タンパク質であり、前記のクロマトグラフ媒体上の捕集帯域で結合されている固定化された被検体又はその類縁体が免疫グロブリンGに結合された7-アミノセファロスポラン酸であり、前記の被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーが抗-ウサギ免疫グロブリンG抗体であり、かつ前記のクロマトグラフ媒体上の対照帯域で結合されている固定化分子がウサギ免疫グロブリンGであり、かつ

(2) 被検体がゲンタマイシン、スルファメタジン及びテトラサイクリンからなる群から選択される抗生物質であり、ビオチンに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーが抗-被検体抗体であり、前記の被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーが抗-ウサギ免疫グロブリンGであり、前記クロマトグラフ媒体上の捕集帯域で結合されている固定化被検体又はその類縁体がウサギ以外の種以外の種の免疫グロブリンGに共有結合された被検体であり、かつ前記の対照帯域で結合されている固定化分子がウサギ免疫グロブリンGである

組み合わせからなる群から選択される請求項9記載のイムノアッセイ装置。

11. 競合イムノアッセイ装置であって、

(a) (i)それぞれの試料調製帯域は補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーを溶解可能な形で含むものである複数の試料調製帯域、及び

(ii) 前記第一の対向させ得る構成部品上の前記複数の試料調製帯域から離れた吸収剤であって、その中に流体を吸収するための吸収剤を含んでなる第一の対向させ得る構成部品、並びに

(b) (i)それぞれの試料調製帯域当たりにつき1つである複数の第一のクロマトグラフ媒体であって、それぞれの第一のクロマトグラフ媒体は第一と第二の端部を有しかつ該媒体上に下記の2つの帯域：

(A) 該第一のクロマトグラフ媒体に結合されている固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域と、

(B) 前記第一のクロマトグラフ媒体に結合されている第一のメンバーに特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーであって、固定化分子の第二の帯域と

を含む複数の第一のクロマトグラフ媒体と、

(ii) それぞれの試料調製帯域当たりにつき1つである複数の第二のクロマトグラフ媒体であって、それぞれの第二のクロマトグラフ媒体は第一と第二の端部を有しかつ該媒体上に比較帯域を含み、該比較帯域はそれに固定化された既知

量の被検体又はその類縁体を含むものである複数の第二のクロマトグラフ媒体と

(iii)それぞれの第二のクロマトグラフ媒体当たりにつき1つである複数の比較標識帯域であって、それぞれの比較標識帯域はその中に被検体又はその類縁体に対する標識された特異結合パートナーを前記第二のクロマトグラフ媒体と操作可能な接触において溶解可能な形で含むものである複数の比較標識帯域とを含む、前記第一の対向させ得る構成部品に蝶着し得る第二の対向させ得る構成部品

を具備してなり、

前記第一の対向させ得る構成部品と、前記第二の対向させ得る構成部品とを、これらが対向していない位置から対向した状態にした場合に、複数の試料調製帯域がそれぞれの第一のクロマトグラフ媒体の第一の端部と操作可能な接触をして、試料と、補助特異結合パートナーの第一のメンバーに結合された被検体用の標識された特異結合パートナーとが、それぞれの第一のクロマトグラフ媒体に加えられ、かつ吸着剤がそれぞれの第一のクロマトグラフ媒体の第二の端部及びそれぞれの第二のクロマトグラフ媒体の第二の端部と操作可

能な接触をして、流体を第一のクロマトグラフ媒体及び第二のクロマトグラフ媒体を通してそれぞれの第一の端部からそれぞれの第二の端部まで引き寄せ、それによって前記装置が少なくとも一つの第一及び第二のクロマトグラフ媒体において被検体の存在について検出可能な競合表示を与えるものである、競合イムノアッセイ装置。

12. 第一の対向させ得る構成部品上の複数の試料調製帯域のそれぞれがさらに、被検体と実質的に架橋反応しない分子を結合する第二の標識された特異結合パートナーを溶解可能な形で含みかつそれぞれの第一のクロマトグラフ媒体がさらに流れ調節指示剤を含み、該流れ調節指示剤がそれぞれの第二の標識された特異結合パートナーを結合する分子を含み、それによってそれぞれの流れ調節指示剤がそれぞれの第一のクロマトグラフ媒体で流れが生じているという陽性表示を与えるものである、請求項11記載のイムノアッセイ装置。

13. 補助特異結合対の第一のメンバーがジオチンである請求項1記載のイムノアッセイ装置。

14. 補助特異結合対の第二のメンバーがストレプトアビジンである請求項1記載のイムノアッセイ装置。

15. 少なくとも一つの被検体の検出及び／又は測定用の試験キットであって、別々の容器に包装され、

(a) 請求項1記載のイムノアッセイ装置と、

(b) それぞれの比較標識帯域において前記の被検体又はその類縁体に対する標識された特異結合パートナーを溶解するための液体とを含有する、被検体の検出及び／又は測定用の試験キット。

16. 競合イムノアッセイ装置であって、

(a)(i)それぞれの試料調製帯域が

(A) 溶解可能な形の、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーと、

(B) 溶解可能な形の、被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーに共有結合された所定量の被検体又はその類縁体を含む複数の試料調製帯域、及び

(ii) 前記試料調製帯域から離された吸収剤を含んでなる第一の対向させ得る構成部品、並びに

(b) クロマトグラフ媒体のそれぞれの上に別個に下記を重ねていない帯域：

(i) クロマトグラフ媒体に結合された固定化被検体又はその類縁体の第一の、捕集帯域と、

(ii) クロマトグラフ媒体に結合されている第一のメンバーに特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーであって固定化分子を含む第二の、検出帯域と、

(iii) クロマトグラフ媒体に結合された被検体又はその類縁体に共有結合されている標識された特異結合パートナーに特異的に結合され得る固定化分子を含む第三の、対照帯域と



を含む、第一と第二の端部を有する複数のクロマトグラフ媒体を含んでなる、第二の対向させ得る構成部品

を具備してなり、

前記第一の対向させ得る構成部品と前記第二の対向させ得る構成部品とをこれらが対向していない位置から対向した状態にした場合に、前記吸収剤がそれぞれのクロマトグラフ媒体の第二の端部と操作

可能な接触をしかつ前記複数の試料調製帯域が前記クロマトグラフ媒体の第一の端部と接触して、試験試料と、前記の補助特異結合対の第一のメンバーに結合された被検体用の溶解され標識された特異結合パートナーと、標識された特異結合パートナーに共有結合している所定量の被検体又はその類縁体とが、第一の端部から第二の端部にそれぞれのクロマトグラフ媒体を通して流れ、それによって前記装置が少なくとも一つの第一及び第二のクロマトグラフ媒体において被検体の存在について検出可能な競合表示を与えるように、前記第一の対向させ得る構成部品と前記第二の対向させ得る構成部品とが配置される、競合イムノアッセイ装置。

17. 前記の補助特異結合対の第一のメンバーがビオチンである請求項18記載のイムノアッセイ装置。

18. 前記の補助特異結合対の第二のメンバーがアビジンである請求項17記載のイムノアッセイ装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 競合イムノアッセイ装置

## 発明の背景

本発明は、特に競合アッセイを行うためのものであり、試料の特性を決定するための試験片又はアッセイ装置、ユニット化ハウジング、並びに試験片とハウジングを組み込んだキット、並びに前記の試験片及びハウジングを使用して試料の特性を決定する方法に関する。

被検体、特に生物学的に重要な被検体の検出及び／又は測定に使用される多くの分析システムの中にクロマトグラフアッセイシステムがある。

かかるクロマトグラフシステムは、種々の体の異常や病気の迅速な診察室内（イン・オフィス）診断及び治療監視のために内科医及び医療技術者によって頻繁に使用される。また、該クロマトグラフシステムは、かかる体の異常や病気の在宅監視のために患者自身によって使用されることが次第に多くなっている。

かかるシステムの最も重要なものの中に、薄くて平らな吸収剤媒体の一方から他方へ溶剤が移動する“薄層”システムがある。

かかる薄層システムを用いて行うことができる最も重要な試験の中に、抗原又はハプテンとこれに対応する抗体との間の特異的相互作用に依存するイムノアッセイがある。イムノアッセイを臨床上重要な分子の存在及び／又はスライド（マウント）を調べる手段として使用することは、ある時期から知られている。早くも1956年に、

J.M. Singer により、慢性関節リウマチに関連した因子の検出に、免疫に基づくラテックス凝集反応試験を使用することが報告された [J.M. Singer ら, Am. J. Med., 22, 888-892 (1956)]。

イムノアッセイに関連して使用される種々のクロマトグラフ法の中に、イムノクロマトグラフィーとして知られている方法がある。イムノクロマトグラフアッセイは、検出すべき抗原-抗体複合体の性質と該複合体を生成させるのに必要な反応の順序とに応じて、主要な2つのカテゴリー：すなわち“サンドイッチ”法と“競合”アッセイに分けられる。検出すべき抗原は、ヘリコバクター・ピロリ

(H. pylori)特異抗体の血清学的アッセイのように、それ自身が抗体であり得る。かかる場合には、検出すべき抗体は特異抗原に結合させ得る。あるいは、検出すべき抗原は、第1の抗体- 検出すべき被検体に結合する標識した第2の抗体を使用することによって間接的に検出できる。

競合イムノアッセイにおいて、標識は典型的には、抗体の結合に関して試料中に存在する未標識の被検体と競合する標識された被検体又は被検体類縁体である。競合イムノアッセイは典型的にはハプテンのような被検体の検出に使用される。それぞれのハプテンは一価であり、しかも1個の抗体分子だけを結合できる。競合イムノアッセイ装置の例は、Deutsch らに付与された米国特許第4,235,601号、Liottaに付与された米国特許第4,442,204号及びBuechlerらに付与された米国特許第5,208,535号各明細書に記載の装置である。これらの米国特許明細書の全部が本明細書において参考文献として参照される。

現在利用し得る、試験片を使用するクロマトグラフ法は有効であ

るが、多数の欠点を有している。糞便試料のような多くの試料は、クロマトグラフ媒体（クロマトグラフィック メジウム）の細孔を詰まらせる粒状物質を含有し、イムノクロマトグラフ法を著しく阻害する。別の試料、例えば血液は、試験の読み取りを困難にする細胞や着色成分を含有している。さらに別の試料、例えば牛乳は、妨害物を生成し得る脂肪粒又は他の成分を含有している。前記試料が妨害物を生成しない場合であっても、現存するクロマトグラフ試験装置を用いて、試料をクロマトグラフ媒体に試料前部がクロマトグラフ媒体を均一に移動するように加えて、結合が均一で直線的な要領で生じる領域に試料が達することを保証することは困難である場合が多い。

現在入手し得る試験片に関しては、分析すべき試料又は実施すべきアッセイの性質に起因する別の問題がある。かかる装置に関しては、感度を向上させるために望ましい場合が多い洗浄工程を実施することができずかつバックグラウンドまで下げることができない。また、前記装置内でブレインキューベーション工程を実施することは困難であり、多くの場合には不可能である。さらにまた、種々様々な分離、例えば牛乳から脂肪の分離又はトルエンからのベンゼンの分離のような

有機薬品の分離を実施できるイムノクロマトグラフアッセイ装置に対する要求がある。

試料の調製や廃棄物の発生は、イムノクロマトグラフィーに現在利用し得る装置及び方法に関する別の問題を招く。感染した血液及び血液画分、並びに他の体分泌物によって蔓延する病気、例えばAIDSや肝炎の流行の増大は、これらの問題を悪化させている。試料（例えば糞便）又は試料採取装置（例えば咽喉用綿棒）をクロマト

グラフ媒体に直接に加えることはまれにしかできない。試料をクロマトグラフ媒体に加える前に、通常は数回の抽出及びいくつかの前処理反応を必要とする。これらの反応は典型的には、試験を行う内科医又は技術者によって試験管又はマイクロフューズ管のような数個の小さな容器中で実施され、ピペットのような移し換え装置を必要とする。この場合、これらの移し換え装置のそれぞれは汚染され、しかも不注意により廃棄物に接触するかもしれない作業者又は人々が汚染されないように特別な対策を講じて処理しなければならない。

さらに、現在利用し得る試験装置は有効であるが、特に競合イムノアッセイ用には、一般的に試験試料中に存在する被検体の濃度について半定量的又は定量的な表示を与えるのに適していない。典型的には、このような半定量的又は定量的な表示を得るには、例えば検定（カリブレーション）のために、二つ以上の試験装置を必要とする。二つ以上の試験装置を使用すると、時間及び材料の消費がこれまで以上に多くなり、しかもアッセイの実施中に間違いを犯し得る可能性が大きくなる。特に、汚染されているかもしれない試料に関しては、対照（コントロール）だけを含んでいると思われる装置が、実際には病原体を含有しているかもしれない試料を含んでいることが偶然にもあるという関心事があり得る。従って、対照として又は検定のために別のアッセイ装置を使用することなく、一つのアッセイ装置で被検体濃度について定量的又は半定量的な表示を測定できることが好ましい。

試験が正確に行われているという陽性表示及び流れがクロマトグラフアッセイ装置内で適切に生じているという陽性表示を与えるア

ッセイ装置に対する別の要求がある。

従って、種々様々なクロマトグラフアッセイを取り扱うことができる改良されたアッセイ装置に対する要求がある。かかる装置は、あらゆる型のイムノアッセイ、特に競合イムノアッセイ、及びクロマトグラフィーを使用する別の型のアッセイを扱うことができるものであるべきである。かかる装置は、抽出容器及び移し換え装置を必要としないように、汚染されているかもしれない試料又は試料調製装置を直接に収容できるものであるべきである。かかる装置、特に試験片の形状の装置はまた、着色試料又は粒状物を含有する試料について妨害なしにイムノクロマトグラフアッセイを行うことができるものであるべきであり、しかも上記試料をクロマトグラフ媒体に均一に送達することができかつ試験の正確度及び精度を一様に向上させることができるものであるべきである。さらにまた、かかる改良された試験片は、一つのアッセイ装置で付加的な対照アッセイ装置を必要とせず被検体濃度について半定量的又は定量的な表示を実施できるものであるべきであり、しかも装置内で流れが適切に生じているという陽性表示及びアッセイが正確に行われているという陽性表示を与えるものであるべきである。

### 概要

本発明者は、前記の要求を満たし、しかも一つのアッセイ装置で付加的な対照アッセイ装置を必要とせず被検体濃度について半定量的又は定量的な測定を行うアッセイ装置を開発した。また、本発明のアッセイ装置はアッセイの適切な遂行に関する陽性表示も提供する。この装置は種々様々な被検体、特にハプテンについて競合イ

ムノアッセイを行うことができる。

本発明の一つの要旨は、競合イムノアッセイ装置であって、

(1)(a)補助特異結合対の第一のメンバーに結合され(コンジュゲート)かつ標識された被検体用特異結合パートナーを溶解しないしは分析し得る(リゾルビライザブル)形態で含む試料調製帯域、及び

(b)前記第一の対向させ得る構成部品上の前記試料調製帯域から離れた吸収剤であって、その中に流体を吸収するための吸収剤とを含んでなる第一の対向さ

せ得る (opposable) 構成部品、並びに

(2)(a) 第一と第二の端部を有する第一のクロマトグラフ媒体であって、該媒体上に下記の2つの帯域：

(i) 第一のクロマトグラフ媒体に結合されている固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域と；

(ii) 第一のクロマトグラフ媒体に結合されている第一のメンバーに特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーである固定化分子の第二の帯域

を含む第一のクロマトグラフ媒体と；

(b) 第一と第二の端部を有する第二のクロマトグラフ媒体であって、該媒体上に比較帯域を含み、該比較帯域はそれに固定化された既知量の被検体又はその類縁体を含むものである第二のクロマトグラフ媒体と；

(c) 比較標識帯域であって、その中に被検体又はその類縁体に対する標識された特異結合パートナーを前記第二のクロマトグラフ媒体と操作可能な（オペラブル）接触をして溶解可能な形で含む比較標識帯域と

を含む、前記第一の対向させ得る構成部品に媒着し得る第二の対向

させ得る構成部品

を具備してなる競合アッセイ装置である。

前記第一の対向させ得る構成部品と、前記第二の対向させ得る構成部品とを、これら構成部品同士が対向していない位置から対向した状態にした場合に、前記試料調製帯域が前記第一のクロマトグラフ媒体の第一の端部と操作可能な接触をして、試料と、ビオチンに結合された被検体用の標識された特異結合パートナーとが前記第一のクロマトグラフ媒体に加えられる。また、前記吸収剤も前記第一のクロマトグラフ媒体の第二の端部及び前記第二のクロマトグラフ媒体の第二の端部と操作可能な接触をして、流体を前記第一のクロマトグラフ媒体及び前記第二のクロマトグラフ媒体を通してこれら2つのクロマトグラフ媒体のそれぞれの第一の端部からそれぞれの第二の端部に引き寄せ、それによって前記装置は、前記第一のクロマトグラフ媒体の検出帯域と前記第二のクロマトグラフ媒体の比較

帯域とにおいて結合された標識の強さを比較することによって、所定量よりも多い量の被検体の存在について検出可能な表示を与える。

第一の対向させ得る構成部品上の試料調製帯域がさらに第二の標識された特異結合パートナーであって被検体と実質的に架橋反応しない分子を結合する第二の標識された特異結合パートナーを溶解可能な形で含み、かつ第一のクロマトグラフ媒体がさらに流れ調節指示剤を含み、該流れ調節指示剤は前記第二の標識された特異結合パートナーを結合する分子を含むものであり、それによって該流れ調節指示剤が、流れが前記第一のクロマトグラフ媒体を通して生じているという陽性表示を与えるのが好ましい。

補助特異結合対の第一のメンバーはビオチンであるのが好ましい。補助特異結合対の第一のメンバーがビオチンである場合には、該補助特異結合対の第二のメンバーはストレプトアビジン(streptavidin)であるのが好ましい。

この装置の一つの代表的な具体的態様では、被検体は $\beta$ -ラクタム系抗生物質であり、前記の固定化された被検体又はその類縁体の第一の帯域は免疫グロブリンに結合された7-アミノセファロスポラン酸であり、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーはビオチン化ペニシリン結合性タンパク質である。

この装置の別の代表的な具体的態様では、被検体はゲンタマイシン、スルファメタジン及びテトラサイクリンからなる群から選択される抗生物質であり、前記の固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域は免疫グロブリンに共有結合された被検体であり、かつ補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーはビオチン化抗-被検体抗体である。

本発明の別の要旨は、被検体の検出及び／又は測定用の試験キットであって、別々の容器に包装され、

- (1) 前記のイムノアッセイ装置と；
  - (2) 前記の比較標識帯域において被検体又はその類縁体に対する前記の標識された特異結合パートナーを溶解するための液体
- とを含む、被検体の検出及び／又は測定用の試験キットである。

本発明のさらに別の要旨は、単一のクロマトグラフ媒体を使用して検出機能と対照機能の両方を提供する競合イムノアッセイ装置の別の変形である。この競合イムノアッセイ装置の変形は、

(1)(a)(i) 溶解可能な形の、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーと、

(ii) 溶解可能な形の、被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーに共有結合された所定量の被検体又はその類縁体を含む試料調製帯域、及び

(b) 前記試料調製帯域から離れた吸収剤を含んでなる第一の対向させ得る構成部品、並びに

(2) クロマトグラフ媒体の上に別個に下記の重なっていない帯域：

(a) クロマトグラフ媒体に結合された固定化被検体又はその類縁体の第一の、捕集帯域と；

(b) クロマトグラフ媒体に結合されている第一のメンバーに特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーである固定化分子を含む第二の、検出帯域と；

(c) クロマトグラフ媒体に結合された被検体又はその類縁体に共有結合されかつ標識された特異結合パートナーに特異的に結合され得る固定化分子を含む第三の、対照帯域と

を含む、第一と第二の端部を有するクロマトグラフ媒体を含んでなる、第二の対向させ得る構成部品を具備してなるものである。

本発明のアッセイ装置のこの態様においては、前記第一の対向させ得る構成部品と前記第二の対向させ得る構成部品とを、これらが対向していない位置から対向した状態にもって行った場合に、前記吸収剤が前記クロマトグラフ媒体の第二の端部と操作可能な接触をしかつ前記試料調製帯域が前記クロマトグラフ媒体の第一端部と接



触して、試験試料と、前記の補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーであって溶解された特異結合パートナーと、標識された特異結合パートナーに共有結合している所定量の被検体又はその類縁体とが第一の端部から第二の端部に前記クロマトグラフ媒体を通じて流れるように、第一の対向させ得る構成部品と第二の対向させ得る構成部品とが配置される。その結果、前記装置は、前記の第二のクロマトグラフ媒体の検出帯域と、対照帯域とにおいて結合された標識の強さを比較することにより、所定量よりも多い量の被検体の存在について検出可能な表示を与える。

この装置の一つの代表的な具体的態様では、前記の補助特異結合対の第一のメンバーはジオチンであり、該補助特異結合対の第二のメンバーはストレプトアビジンであり、被検体は $\beta$ -ラクタム系抗生物質であり、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーはペニシリン結合性タンパク質であり、前記クロマトグラフ媒体上の捕集帯域で結合されている固定化被検体又はその類縁体は免疫グロブリンGに共有結合された7-アミノセファロスポラン酸であり、被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーは抗-ウサギ免疫グロブリンG抗体であり、かつ前記クロマトグラフ媒体上の対照帯域で結合されている固定化分子はウサギ免疫グロブリンGである。

あるいはまた、被検体はゲンタマイシン、スルファメタジン及びテトラサイクリンからなる群から選択される抗生物質であってもよく、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーは抗-被検体抗体であってもよく、被検

体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーは抗-ウサギ免疫グロブリンGであってもよく、かつ前記クロマトグラフ媒体上の捕集帯域で結合されている固定化被検体又はその類縁体はウサギ以外の種以外の種の免疫グロブリンGに共有結合された被検体であってもよく、かつ対照帯域で結合されている固定化分子はウサギ免疫グロブリンGであってもよい。

本発明のさらに別の要旨は、2以上のアッセイを同時に行うことができる多重

アッセイ装置である。かかる多重アッセイ装置の一つの態様は、

(1)(a)それぞれの試料調製帯域が補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーを溶解可能な形で含むものである複数の試料調製帯域；及び

(b)前記第一の対向させ得る構成部品上の前記複数の試料調製帯域から離れた吸収剤であって、その中に流体を吸収するための吸収剤

を含んでなる第一の対向させ得る構成部品、並びに

(2)(a)それぞれの試料調製帯域当たりにつき1つである複数の第一のクロマトグラフ媒体であって、それぞれの第一のクロマトグラフ媒体は第一と第二の端部を有しかつ該媒体上に下記の2つの帯域：

(i) 該第一のクロマトグラフ媒体に結合されている固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域と；

(ii)前記第一のクロマトグラフ媒体に結合されている第一のメンバーに特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーである、固定化分子の第二の帯域と

を含む複数の第一のクロマトグラフ媒体と；

(b)それぞれの試料調製帯域当たりにつき1つである複数の第二のクロマトグラフ媒体であって、それぞれの第二のクロマトグラフ媒体は第一と第二の端部を有しかつ該媒体上に比較帯域を含み、該比較帯域はそれに固定化された既知量の被検体又はその類縁体を含むものである複数の第二のクロマトグラフ媒体と；

(c)それぞれの第二のクロマトグラフ媒体当たりにつき1つである複数の比較標識帯域であって、それぞれの比較標識帯域はその中に被検体又はその類縁体に対する標識された特異結合パートナーを前記第二のクロマトグラフ媒体と操作可能な接触において溶解可能な形で含むものである複数の比較標識帯域と

を含む、前記第一の対向させ得る構成部品に蝶着し得る第二の対向させ得る構成部品

を具備してなるものである。

本発明の多重アッセイ装置のこの態様では、第一の対向させ得る構成部品と第

二の対向させ得る構成部品とを、これらが対向していない位置から対向した状態にもっていった場合に、複数の試料調製帯域がそれぞれの第一のクロマトグラフ媒体の第一の端部と操作可能な接触をして、試料と、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーとが、それぞれの第一のクロマトグラフ媒体に加えられ、かつ吸着剤がそれぞれの第一のクロマトグラフ媒体の第二の端部及びそれぞれの第二のクロマトグラフ媒体の第二の端部と操作可能な接触をして、流体を第一のクロマトグラフ媒体及び第二のクロマトグラフ媒体を通してそれぞれの第一の端部からそれぞれの第二の端部まで引き寄せる。その結果、装置は、それぞれの第一のクロマトグラフ媒体の検出帯域とそ

れぞれの第二のクロマトグラフ媒体の比較帯域とにおいて、結合された標識の強さを比較することによって所定量よりも多い量のそれぞれの第一及び第二のクロマトグラフ媒体における被検体の存在について検出可能な表示を与える。

本発明のこの態様の多重アッセイ装置を組み込んだ試験キットは、

- (1) イムノアッセイ装置と、
- (2) それぞれの比較標識帯域において被検体又はその類縁体に対する前記の標識された特異結合パートナーを溶解するための液体とを含む。

本発明の多重アッセイ装置の別の態様は、

- (1)(a) それぞれの試料調製帯域が
  - (i) 溶解可能な形の、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーと、
  - (ii) 溶解可能な形の、被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーに共有結合された所定量の被検体又はその類縁体を含む複数の試料調製帯域；及び
- (b) 前記試料調製帯域から離れた吸収剤を含んでなる第一の対向させ得る構成部品、並びに
- (2) クロマトグラフ媒体のそれぞれの上に別個に下記の重なっていない帯域：
  - (a) クロマトグラフ媒体に結合された固定化被検体又はその類縁体の第一の、

捕集帯域と、

(b) クロマトグラフ媒体に結合されている第一のメンバーに特異

的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーであって固定化分子を含む第二の、検出帯域と、

(c) クロマトグラフ媒体に結合された被検体又はその類縁体に共有結合されている標識された特異結合パートナーに特異的に結合され得る固定化分子を含む第三の、対照帯域と

を含む、第一と第二の端部を有する複数のクロマトグラフ媒体を含んでなる、第二の対向させ得る構成部品

を具備してなるものである。

本発明のアクセス装置のこの態様においては、前記第一の対向させ得る構成部品と前記第二の対向させ得る構成部品とをこれらが対向していない位置から対向した状態にした場合に、前記吸収剤がそれぞれのクロマトグラフ媒体の第二の端部と操作可能な接触をしかつ前記複数の試料調製帯域が前記クロマトグラフ媒体の第一端部と接触して、試験試料と、前記の補助特異結合対の第一のメンバーに結合された被検体用の溶解され標識された特異結合パートナーと、標識された特異結合パートナーに共有結合している所定量の被検体又はその類縁体とが、第一の端部から第二の端部にそれぞれのクロマトグラフ媒体を通して流れるように、前記第一の対向させ得る構成部品と前記第二の対向させ得る構成部品とが配置される。

#### 図面の簡単な説明

本発明の前記の種々の特徴及び他の特徴、種々の態様並びに種々の利点は、下記の記載、添付の請求の範囲及び添付図面を参照してよりよく理解されるようになるであろう。

添付図面において、第1図は2種類のクロマトグラフ媒体を用い

る本発明の競合イムノアクセス装置の第一の態様を表す図面であり；

第2図は単一のクロマトグラフ媒体を用いる本発明の競合イムノアクセス装置

の第二の態様を表す図面であり；

第3図は第1図の装置の原理に従って操作する本発明の多重アッセイ装置の第一の態様を表す図であり；かつ

第4図は第2図の装置の原理に従って操作する本発明の多重アッセイ装置の第二の態様を表す図である。

## 説明

### 定義

本明細書の記載の内容において、下記の用語は特に示さない限りは以下の通りに定義される。

特異結合パートナー：関与する分子の3次元構造に依存する特異的非共有相互作用によって相互作用する1対の分子の構成成分を意味する。特異結合パートナーの典型的な対としては、抗原-抗体、ハプテン-抗体、ホルモン-レセプター、核酸鎖-相補的核酸鎖、基質-酵素、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質-ペニシリン結合性タンパク質、阻害剤-酵素、炭水化物-レクチン、ビオチン-アビジン及びウイルス-細胞レセプターが挙げられる。

イムノアッセイ：本明細書で使用するように、“イムノアッセイ”という用語は、前記の特異結合パートナーの少なくとも一つを伴うアッセイを包含し、しかもかかる限定が明記されない限りは、特異結合パートナーが抗体であるアッセイには必ずしも限定されない。

操作可能な接触：2つの固体状構成部品が、液体、典型的には水性液が毛管現象又は別の方法により前記2つの構成部品的一方から他方に実質的に連続して流れることができるような要領で直接的又は間接的に接触している場合に、2つの固体状構成部品が操作可能な接触をしているという。“直接接触”とは、2つの構成部品が端部と端部又は前面と後面のような物理的な接触をしていることを意味する。典型的には、2つの構成部品が直接接触している場合には、これらは約0.5～約3mmの重なりをもって重なっている。しかしながら、これらの構成部品は端部を隣り合わせながら配置され得る。“間接的接触”とは、2つの構成部品

が物理的に接触していないが、1つ又はそれ以上の導体によって橋架けされることを意味する。

被検体：“被検体”という用語は、分析すべき実際の分子とその類縁体及び誘導体の両方を包含し、この場合には、かかる類縁体及び誘導体は親和性及び架橋反応性の点で被検体自体の分子に実質的に同等であるという意味で、アッセイで使用される他の分子を結合する。

抗体：“抗体”という用語は、適当な特異性をもつ無傷の完全な抗体分子及び抗体断片〔例えば、Fab、F(ab')及びF(ab')<sub>2</sub>断片〕並びに化学修飾された完全な抗体分子及び抗体断片、例えばサブユニットの試験管内再会合によって組み立てられたハイブリッド抗体を包含する。

補助特異結合対：“補助特異結合対”という用語は、互いに特異結合パートナー（この用語は前記に定義してある）である1対の分

子をいい、本発明のアッセイ装置で行われるアッセイに関与する別の分子に特異的結合親和性をもつ分子対のいずれの構成成分でもない。補助特異結合対の例はビオチン-アビジンである。

### 1. クロマトグラフアッセイ装置

本発明の一つの態様は、特に競合イムノアッセイによる、被検体及び生物学的試料のアッセイに特に有用なクロマトグラフアッセイ装置からなる。これらの装置は、生物学的試料を複数の予備抽出工程を必要とすることなく直接加えるのに適しており、しかも粒状物又は着色試料によって生ずるアッセイ結果への妨害を最小限にするように組み立てられる。

前記装置は少なくとも2つの実質的に平坦に対向させ得る構成部品を有する。前記の実質的に平坦な構成部品のうちの一方はその表面にクロマトグラフ媒体を有する。

また、前記装置は対向させ得る構成部品同士を対向させる手段及び該装置に圧力を加える手段も有する。典型的には、対向させ得る構成部品同士を対向する状態にもってゆくには、直接手で閉じることによって行う。加える圧力は、被検体

の検出及び／又は測定用のクロマトグラフ媒体に試料が加えられるように、流体を一方の対向させ得る構成部品から他方の対向させ得る構成部品まで対向させ得る構成部品同士に対して実質的に垂直な向きで移動させるのに十分なものである。また、圧力は流体をクロマトグラフに通してクロマトグラフィーのプロセスを促進させ、少ない時間で検出可能な結果を与える。さらにまた、圧力は装置において抽出工程のような工程の遂行を可能にし、吸収剤により過剰の流体をクロマトグラフ媒体から除去してアッセイのバックグラウンドを下げるのに使用できる。圧力は前記の構成部品同士を対向した状態に置くことによって生じ、鉤又は止め金のようなかみ合わせによって構成部品同士を対向させた状態で保持することによって維持される。圧力は、個々のア

ッセイについて最適であるべく補正され、装置、前記クロマトグラフに使用される材料、試料の容量及び性質、特異結合パートナー及び標識の性質、並びに他の因子に応じて変化させ得る。

本発明のアッセイ装置は、試料をいったん加えると、装置のクロマトグラフ媒体にさらに液体を加えることを必要とせずにイムノアッセイを行う。これは試料又は特異結合パートナーの希釈を避け、アッセイの最大感度を保つ。

典型的には、本発明の装置は競合イムノアッセイを行うために構成される。しかしながら、装置は別の型のイムノアッセイの遂行に同様の原理で構成し得、しかもこれら装置は本発明の範囲内にある。

競合イムノアッセイを行うのに適した装置においては、クロマトグラフ媒体はその上に標識された成分用の特異結合パートナーの検出帯域を組み込んである。標識された成分は、補助特異結合対の第一のメンバーであり、検出帯域は補助特異結合対の第二のメンバーを含む。

補助特異結合対を用いる一つの特に好ましい別の態様においては、検出帯域はビオチンに特異的親和性をもつ固定化分子であり、アッセイはビオチンに結合された被検体用の標識された特異結合パートナーを含む。ビオチンに特異的親和性をもつ固定化分子は典型的にはストレプトアビジンであるが、アビジン又は抗ービオチン抗体であってもよい。

本明細書で使用する“ビオチン”という用語は、ビオチンそれ自体だけでなく、ビオチンの誘導体とその特異的結合性パートナーとの間の結合がビオチン自体と特異結合パートナーとの間の結合に実

質的に等しいビオチンの誘導体も包含する。これらの誘導体としては、イミノビオチン及びスペーサーに共有結合されたイミノビオチン、例えば $\epsilon$ -カプロアミドが挙げられる。また、ビオチンの別の誘導体、例えば異なる長さをもつスペーサーを組み込んだ誘導体も使用できる。

検出帯域はクロマトグラフ媒体よりも実質的に小さい。検出帯域は典型的にはクロマトグラフ媒体の幅全体に及ぶが、クロマトグラフ媒体の幅全体よりも小さいスポットに限定し得る。

典型的には、アッセイの実施後の被検体の検出及び／又は測定は、肉眼で検出可能な標識された成分を使用することによって生じる。標識された成分は、肉眼で検出可能な標識に連結された被検体又はその類縁体であるか又は肉眼で検出可能な標識に連結された被検体用特異結合パートナーであるのが好ましい。競合イムノアッセイに関して以下に説明する態様（アレンジ）において、標識された成分は典型的には補助特異結合パートナーの第一のメンバーに結合された被検体用の標識された特異結合パートナーである。補助特異結合対の第一のメンバーはビオチンであるのが好ましい。補助特異結合対の第一のメンバーがビオチンである場合には、補助特異結合対の第二のメンバーはストレプトアビジンであるのが好ましい。

配位子類縁体、例えば被検体類縁体は当該技術分野では周知であり、例えば本明細書において参考文献として参照されるルベンスタイン(Rubenstein)らに付与された米国特許第3,817,837号に記載されている。被検体類縁体はそれよりも大きいタンパク質、例えばイムノアッセイにおいて不活性である免疫グロブリンにリンカーを介して結合し得る。リンカーの長さはアッセイ装置で行われるアッセイ

イにおいて最適に行われるように選択し得る。種々の連結反応を官能基に応じて使用して被検体類縁体を合成できる。かかる連結反応は例えばルベンスタインら



に付与された米国特許第3,817,837号に記載されている。

本発明のアクセス装置は、2以上のアクセスを同時に行うために構成し得る。かかる装置において、実質的に平坦な2つの構成部品のうちの一方は該部品上に少なくとも2つの別々の接触していないクロマトグラフ媒体を有する。これらについてさらに以下で説明する。

#### A. 本発明の装置に共通な構成部品

多数の構成部品が本発明のアクセス装置に共通しており、便宜上ここで説明する。

##### 1. クロマトグラフ媒体

クロマトグラフ媒体は細片すなわちストリップである。典型的には、ストリップは実質的に平坦なものであるが、この条件は全ての用途においては必要とされない。ストリップは長方形であり、第一及び第二の端部と第一及び第二の面とを有する。この明細書の記載全体を通じて、“第一の端部”という用語は液体が最初にクロマトグラフ媒体に加えられる端部をいい、“第二の端部”という用語はクロマトグラフ媒体の反対側の端部をいう。クロマトグラフ媒体の第一の端部又はその近くで加えられる液体は試料又は処理された試料であり得るが、必ずしも試料又は処理された試料でなくともよい。クロマトグラフ媒体は、被検体及び被検体-抗体複合体の薄層ク

ロマトグラフィー用の媒体として適した材料、例えばニトロセルロース、ナイロン、レーヨン、セルロース、紙又はシリカからなる。クロマトグラフ媒体は必要があれば前処理又は修飾し得る。

検出帯域に配置された試薬は、それが拡散移動に対して安定化されるような方法でクロマトグラフ媒体上に固定される。前記試薬は共有手段又は非共有手段によってクロマトグラフ媒体に結合し得る。これらの両方の手段は当該技術において周知であり、本明細書でさらに説明する必要はない。クロマトグラフ媒体がニトロセルロースである場合には、検出帯域中の試薬は疎水性相互作用によって結合させ得る。

固相に対する試薬の結合は、例えばP. Tijssen著、“Practice and Theory of

Enzyme Immunoassays(酵素イムノアッセイの実際と理論)” (Elsevier, Amsterdam, 1985年発行)、第297-328頁に記載されている。

典型的には、クロマトグラフ媒体は半透明であるので、その上に現れる着色帯域はいずれの側からも目視できる。

## 2. 吸収剤

本発明の多数の装置において、吸収剤はクロマトグラフ媒体の一端又は両端と操作可能な接触をしている。吸収剤は、液体がクロマトグラフ媒体の中に送り込まれ、吸収剤中に蓄積され得るように、液体、典型的には水性液を十分に保持する吸水性材料から作成し得る。代表的な材料としては、濾紙が挙げられるが、これに限定されない。

## 3. 別の流体搬送要素

以下に記載するように、本発明の個々の装置においては、別の種々の流体搬送要素を試料調製帯域、アプリケーター及び／又はコンダクターとして用いることができる。これらの要素は、液体、典型的には水性液を実質的に吸収することなく通す親水性媒体から調製される。かかる材料は当該技術において周知である。

ある場合には、これらの要素はその中に成分を、液体、典型的には水性液を該要素に添加することによって溶解し得る乾燥状態の成分を組み込んでいてもよい。この成分は標識成分又は反応の別の成分であり得る。

## 4. 対向させ得る構成部品

本発明のアッセイ装置の具体的態様の多くは2つの対向させ得る構成部品から構成される。前記構成部品の本体は、アッセイを実施する時間中に前記装置によって行われるアッセイの遂行に関与する液体を含有するために十分に水分不浸透性である積層厚紙製であるのが好ましい。

別のセルロース基材の材料、例えば厚紙又は固体状の漂白亜硫酸塩(SBS)も使用できる。あるいは、前記構成部品の本体は、水分不浸透性のプラスチック製であり得る。適当なプラスチックはLexan(登録商標)のようなポリカーボネートプラスチックである。

対向させ得る2つの構成部品は典型的には螺番で連結され、液体例えば水性液

に不透過性の材料、例えば前記の第一及び第二の対向させ得る構成部品と一体に連結し得るか又はこれらの構成部品に使用される材料と同じであるプラスチック製であるのが好ましい。

## 5. 標識された成分

競合イムノアッセイを行うことを目的とした本発明のアッセイ装置に関して、前記の標識された成分は典型的にはジオチンにも結合されている被検体に対する標識された特異結合パートナーである。しかしながら、別の標識の態様（アレンジ）が使用できる。

標識は肉眼で検出可能な標識、例えばコロイド状の金属標識であるのが好ましい。コロイド状の金属標識は金、銀、銅、鉄又は錫であるのが好ましいが、最も好ましいのは金である。金標識された抗体及び抗原の調製は、Immunocytochemistry: Modern Methods and Applications (J.M. Polak & S. Van Noorden 編, Wright, Bristol, England, 1986年発行), 第8章第115-145 頁のJ. DeMeyの“The Preparation and Use of Gold Probes (金プローブの調製と使用)”に記載されている。かかる標識された抗体及び抗原の調製に関する他の文献は当該技術において公知である。コロイド状の金で標識された抗体は、例えばSigma Chemical Company (ミズリー州セントルイス所在) から商業的に入手し得る。あるいはまた、別のコロイド標識、例えばコロイド硫黄標識又は染料-シリカ標識も使用できる。あまり好ましくない態様においては、肉眼で検出可能な標識は、コロイド状ラテックス標識であり得る。別の標識、例えば放射能標識、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識又は酵素標識を使用することも可能である。

### B. 競合イムノアッセイ用のアッセイ装置

#### 1. 2種類のクロマトグラフ媒体を用いる

##### 競合イムノアッセイ用のアッセイ装置

競合イムノアッセイを行うのに適している本発明の一つの具体的態様は、一つの対向させ得る構成部品上に2種類のクロマトグラフ媒体を使用する。これらのクロマトグラフ媒体の一方はイムノアッセイを行うのに使用され、他方は、被検

体が所定の濃度よりも高い

濃度で試験試料中に存在するか否かを測定することを目的として、既知量の被検体を使用して比較を提供する。

一般に、このイムノアッセイ装置は、

(1)(a)補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーを溶解可能な形で含む試料調製帯域；及び

(b)前記第一の対向させ得る構成部品上の前記試料調製帯域から離れた吸収剤であって、その中に流体を吸収するための吸収剤とを含んでなる第一の対向させ得る構成部品、並びに

(2)(a)第一と第二の端部を有する第一のクロマトグラフ媒体であって、該媒体上に下記の2つの帯域：

(i) 第一のクロマトグラフ媒体に結合されている固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域と；

(ii)第一のクロマトグラフ媒体に結合されいる第一のメンバーに特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーである固定化分子の第二の帯域を含む第一のクロマトグラフ媒体と；

(b)第一と第二の端部を有する第二のクロマトグラフ媒体であって、該媒体上に比較帯域を含み、該比較帯域がそれに固定化された既知量の被検体又はその類縁体を含むものである第二のクロマトグラフ媒体と；

(c)比較標識帯域であって、その中に被検体又はその類縁体に対する標識された特異結合パートナーを前記第二のクロマトグラフ媒体と操作可能な接触をして溶解可能な形で含む比較標識帯域とを含む、前記第一の対向させ得る構成部品に蝶着し得る第二の対向

させ得る構成部品

を具備してなるものである。

前記装置は、第一のクロマトグラフ媒体の検出帯域と、第二のクロマトグラフ媒体の比較帯域とにおける、結合された標識の強度を比較することによって、所

定量よりも多い量での被検体の存在について検出可能な表示を与える。

この装置を第1図に示す。

装置10は、蝶番16で取り付けられた第一の対向させ得る構成部品12と第二の対向させ得る構成部品14を含む。第一の対向させ得る構成部品12は試料調製帯域18を有している。試料調製帯域18は、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーを、液体を試料調製帯域18に加えることによって溶解し得る形で含む。第一の対向させ得る構成部品12は液体を吸収するための吸収剤20をさらに含んでいる。吸収剤20は第一の対向させ得る構成部品12上の試料調製帯域18から隔離して配置される。

第二の対向させ得る構成部品14は、第一のクロマトグラフ媒体22を含む。第一のクロマトグラフ媒体22は第一の端部24と第二の端部26とを有する。第一のクロマトグラフ媒体22は該媒体上に、(i)第一のクロマトグラフ媒体22に結合されている固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域28と、(ii)補助特異結合対の第二のメンバーであって第一のクロマトグラフ媒体22に結合されている第二のメンバーである固定化分子の第二の帯域30とを有する。前記の補助特異結合対の第一のメンバーがビオチンである場合には、ビオチンに対して特異的親和性を有する前記の固定化分子は典型的にはストレプトアビジンであるが、あるいはアビジン又は抗-ビオチン抗体であって

もよい。

また、第二の対向させ得る構成部品14はさらに第二のクロマトグラフ媒体32も含む。第二のクロマトグラフ媒体32は第一の端部34と第二の端部36とを有し、しかも該媒体上に比較帯域38であって該比較帯域38に固定化された既知量の被検体又はその類縁体を含有する比較帯域38を含む。第二の対向させ得る構成部品14はさらに比較標識帯域40を含む。比較標識帯域40はその中に、被検体又はその類縁体に対する標識された特異結合パートナーを該比較標識帯域40に液体、典型的には水性液を加えることによって溶解し得る形で含む。比較標識帯域40は、被検体又はその類縁体に対する前記の標識された特異結合パートナーが溶解されると、これが第二のクロマトグラフ媒体32中に拡散するように、第二のクロマトグラフ

媒体32と操作可能な接触をしている。第一のクロマトグラフ媒体22と第二のクロマトグラフ媒体32は支持体42で支持し得る。支持体42はポリカーボネート(Lexan)のようなプラスチック又は他の不透過性プラスチックであり得る。

第一の対向させ得る構成部品12と第二の対向させ得る構成部品14とをこれらが対向していない位置から対向した状態にもって行った場合には、試料調製帯域18が第一のクロマトグラフ媒体22の第一の端部24と操作可能な接触をして、試料と、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用標識化特異結合パートナーとが第一のクロマトグラフ媒体22に加えられる。第一の対向させ得る構成部品12上の吸収剤20は、第一のクロマトグラフ媒体22の第二の端部26及び第二のクロマトグラフ媒体32の第二の端部36と操作可能な接触をして、流体を第一のクロマトグラフ媒体22及び第二の

クロマトグラフ媒体32を通してこれらの媒体それぞれの第一の端部24及び34から第二の端部26及び36まで引き出す。吸収剤20は第一のクロマトグラフ媒体22及び第二のクロマトグラフ媒体32の両方から流体を吸収できるように十分に大きい。

第一の対向させ得る構成部品12はその中に、第一のクロマトグラフ媒体24上の第二の帯域30と、第二のクロマトグラフ媒体32上の比較帯域38とを見るための開口部44を有し得る。また、装置10は、第一の対向させ得る構成部品12と第二の対向させ得る構成部品14とを対向した状態で保持するために鉤のようなかみ合わせ46及び48と、流体が装置から漏出するのを防止するためのガスケット50とを有し得る。

第二の対向させ得る構成部品14上の第一のクロマトグラフ媒体22は、さらに流れ調節指示剤52を有するのが好ましい。流れ調節指示剤52は第一のクロマトグラフ媒体22の第二の端部26付近に配置される。流れ調節指示剤52を使用する場合には、第一の対向させ得る構成部品12上の試料調製帯域18はさらに第二の標識化特異結合パートナーであって、被検体と実質的に架橋反応しない分子を結合する第二の標識化特異結合パートナーを、液体、典型的には水性液体を加えることによって溶解し得る形で含む。流れ調節指示剤52は、前記の第二の標識化特異結合パートナーを結合する分子を含み、それによって流れ調節指示剤52は流れが第一の

クロマトグラフ媒体22で生じているという陽性表示を与える。

前記アッセイ装置10を用いてアッセイを行う際には、試料を第一の対向させ得る構成部品12上の試料調製帯域18に加える。試料は、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体

用標識化特異結合パートナーを可溶化させ、また被検体と実質的に架橋反応しない分子を結合する第二の標識化特異結合パートナーも可溶化させて流れ調節の表示を与える。次いで、アッセイ装置10は所定時間、代表的には1分～10分間インキュベートさせる。インキュベーションは室温で行い得る。あるいはまた、アッセイ装置10又は該アッセイ装置10の第一の対向させ得る構成部品12は、アッセイをより迅速に行うために室温よりも高い温度、例えば30℃又は37℃まで温度を上げるインキュベーター中に入れることができる。これよりも高い温度が抗体又は他の特異結合パートナー同士の不活性化又は変性を生じない場合には、かかる高い温度も使用し得る。

インキュベーションの後に、緩衝液又は他の水性試薬を第二の対向させ得る構成部品14上の比較標識帯域40に加える。次いで、溶解された被検体又はその類縁体に対する標識化特異結合パートナーを、第二のクロマトグラフ媒体32を通してその第一の端部34からその第二の端部36まで移動させる。

次いで、アッセイ装置10を閉じ、第一の対向させ得る構成部品12と第二の対向させ得る構成部品14とを対向させて、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーであって溶解された該被検体用特異結合パートナーと、存在する場合には被検体と実質的に架橋反応しない分子を結合する第二の標識された特異結合パートナーとを、第一のクロマトグラフ媒体22上の第一の端部に加える。被検体が試料中に存在する場合には、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーが、第一のクロマトグラフ媒体22上の固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域(捕集帯域)28に結合する。こ

の場合には、第一のクロマトグラフ媒体22に結合されている補助特異結合対の固

定化された第二のメンバーを含む第二の帯域30（検出帯域）で信号は検出されない。

しかしながら、被検体が試料中に存在するか又は存在しないかいずれの場合にも、被検体と実質的に架橋反応しない分子を結合する第二の標識化された特異結合パートナーは、第一のクロマトグラフ媒体22の第二の端部26近辺で流れ調整帯域52に結合し、第一のクロマトグラフ媒体を通る適切な流れが生じているという陽性表示を与える。

同時に、比較標識帯域40に最初から存在する被検体又はその類縁体に対する溶解した標識化特異結合パートナーは、第二のクロマトグラフ媒体32を通して第一の端部34から第二の端部36まで移動し、次いで被検体又はその類縁体に対する前記の溶解した標識化特異結合パートナーは第二のクロマトグラフ媒体32上の比較標識帯域38で存在する所定量の固定化被検体又はその類縁体と結合する。

次いで、移動時間、典型的には1～10分後に、使用者は開口部42を介して、第一のクロマトグラフ媒体22上の固定化被検体の第二の帯域30と、第二のクロマトグラフ媒体32上の比較標識帯域38とを肉眼で観察して、該二つの帯域における標識の相対強度を比較して、試験試料中の被検体の濃度について半定量的評価を得る。例えば、比較帯域38が被検体を5 ng含有する場合には、第一のクロマトグラフ媒体22上の第二の帯域30で示される強さが第二のクロマトグラフ媒体32上の比較標識帯域38における強さよりも大きいならば、アッセイ装置10に加えられる試験試料の容量中に5 ngを越える量の被検体が存在する。広範な濃度を使用できる。

。

## 2. 流れ指示剤と組み合わせた対照系を用いるアッセイ

### 装置

本発明のアッセイ装置の別の態様は、試料中の被検体について半定量的表示を与える対照系と流れ指示剤との組み合わせを用いる。この装置は競合イムノアッセイ操作によって操作される。

一般に、この態様の装置は、

- (1) (a) (i) 溶解可能な形の、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標



識された被検体用特異結合パートナーと、

(ii)溶解可能な形の、被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーに共有結合された所定量の被検体又はその類縁体を含む試料調製帯域、及び

(b)前記試料調製帯域から隔離されて配置されている吸収剤を含んでなる第一の対向させ得る構成部品、並びに

(2) クロマトグラフ媒体の上に別個に下記の重ならない帯域：

(a)クロマトグラフ媒体に結合された固定化被検体又はその類縁体からなる第一の、捕集帯域と；

(b)補助特異結合対の第一の成分に特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーであって該クロマトグラフ媒体に結合されている第二の成分である固定化分子を含む第二の、検出帯域と；

(c)クロマトグラフ媒体に結合された被検体又はその類縁体に共有結合されている標識された特異結合パートナーに特異的に結合され得る固定化分子を含む第三の、対照帯域と

を含む、第一と第二の端部を有するクロマトグラフ媒体を含んでなる、第二の対向させ得る構成部品

を具備してなるものである。

前記アクセス装置のこの具体的態様を第2図に示す。アクセス装置は100は、第一の対向させ得る構成部品102と第二の対向させ得る構成部品104とを含む。第一の対向させ得る構成部品102と第二の対向させ得る構成部品104は蝶番106で連結される。第一の対向させ得る構成部品102は試料調製帯域108を有している。試料調製帯域108は、(1)液体によって可溶化できる形の、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーと；(2)液体、典型的には水性液によって可溶化できる形の、被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーに共有結合された所定量の被検体又はその類縁体とを含む。典型的には、前記のように、補助特異結合対の第一のメンバーはビオチンであり、補助特異結合対の第二のメンバーはビオチンに特

異的親和性をもつ固定化分子、例えばアビジン、ストレプトアビジン又は抗- ビオチン抗体である。より典型的には、補助特異結合対の第二のメンバーはストレプトアビジンである。第一の対向させ得る構成部品102 は、該第一の対向させ得る構成部品102 上に試料調製帯域108 から離して配置された吸収剤110 を有する。

第二の対向させ得る構成部品104 は、第一の端部114 と第二の端部116 とをもつクロマトグラフ媒体112 を含む。第一のクロマトグラフ媒体112 は該媒体上に、(1)第一のクロマトグラフ媒体112 に結合されている固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域、すなわち捕集帯域118 と；(2)前記補助特異結合対の第一の成分に特異的

親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーであって、該クロマトグラフ媒体112 に結合されている第二の成分である固定化分子を含む第二の帯域、すなわち検出帯域120 と；(3)クロマトグラフ媒体112 に結合されている固定化分子であって被検体又はその類縁体に共有結合されている標識された特異結合パートナーに特異的に結合され得る固定化分子を含む第三の帯域、すなわち対照帯域122 とを含むものである。これらの帯域は第一の帯域、すなわち捕集帯域118 がクロマトグラフ媒体112 の第一の端部114 に最も近く、また第三の帯域、すなわち対照帯域122 がクロマトグラフ媒体112 の第二の端部116 に最も近く、第二の帯域、すなわち検出帯域120 が第一の帯域、すなわち捕集帯域118 第三の帯域、すなわち対照帯域122 との間にあるように配置される。クロマトグラフ媒体112 は前記のようにプラスチック製支持体24によって支持され得る。

第二の対向させ得る構成部品104 は第一のクロマトグラフ媒体112 の一部分を見ることを可能にする開口部126 を有する。この部分は検出帯域120 と対照帯域122 とを含む。第一の対向させ得る構成部品102 と第二の対向させ得る構成部品104 は鉤のようなようなかみ合わせ128 と130 とによって一緒に保持し得る。第一の対向させ得る構成部品102 と第二の対向させ得る構成部品104 は、装置から流体が漏出するのを防止するためのガスケット132 で囲み得る。

第一の対向させ得る構成部品102 と第二の対向させ得る構成部品104 は、第一の対向させ得る構成部品102 と第二の対向させ得る構成部品104 とをこれらが対

抗していない位置から対向した状態にもって行った場合に、吸収剤110 がクロマトグラフ媒体112 の第二の端部116 と操作可能な接触をするように配置される。それはまた

、試験試料と、可溶化された被検体用特異結合パートナーであって補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーと、該標識された特異結合パートナーに共有結合されている所定量の被検体又はその類縁体とがクロマトグラフ媒体112 を通ってその第一の端部114 から第二の端部116 まで流れるように、第一の対向させ得る構成部品102 上の試料調製帯域108 をクロマトグラフ媒体112 の第一の端部と接触させる。

使用の際には、試料を第一の対向させ得る構成部品102 上の試料調製帯域108 に加えて前記の標識した試薬を可溶化させる。アッセイ装置100 又は第一の対向させ得る構成部品102 は前記の第一の具体的態様について前述したようにインキュベーターに入れることができる。次いで、第一の対向させ得る構成部品102 と第二の対向させ得る構成部品104 とを接触させ、試料と可溶化された標識された成分がクロマトグラフ媒体112 を通ってその第一の端部114 から第二の端部116 まで移動する。

被検体の不存在下では、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーは、固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域、すなわち捕集帯域118 に結合し、しかも補助特異結合対の固定化された第二のメンバーを含んでいる第二の帯域、すなわち検出帯域120 に到達しない。しかしながら、被検体が試料中に存在する場合には、試料中の被検体は、ビオチンに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーに対する結合に関して、第一の帯域、すなわち捕集帯域118 に存在する固定化された被検体又はその類縁体と競合し、次いで標識された被検体用特異結合パートナーの少なくとも若干量は、補助特異結合対の第二の

メンバーであって固定化された第二のメンバーを含んでいる第二の帯域、すなわち検出帯域120 に到達する。次いで、この補助特異結合対の第一のメンバーに結

合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーは、第二の帯域、すなわち検出帯域120で結合され、この位置で検出可能な信号を与える。検出可能な信号の強さは最初の試験試料中の被検体の濃度に比例する。

しかしながら、対照帯域122は、被検体が試料中に存在する否かに関わらず検出可能な信号を生ずる。その理由は、試料調製帯域108中に存在する被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーに共有結合された所定量の被検体又はその類縁体が、対照帯域122において、固定化分子であって前記標識された特結合性パートナーに特異的に結合できる固定化分子に結合するからである。これは、被検体濃度について定量的測定値を得ることができるように、装置全体の適切な流れについての対照帯域及び比較帯域の両方として機能する一定の信号を与える。

### C. 多重アッセイ装置

前述した装置は単一のアッセイを行う装置という点から説明されるものであるが、同じ原理が2以上のアッセイを同時に実施できる多重アッセイ装置を構成するのに使用できる。これらのアッセイ装置は、アッセイを同じ被検体又は異なる被検体について同時に行うことができるように構成し得る。例えば、本発明の多重アッセイ装置は、多数の異なる被検体又は同一試料の種々のアリコートすなわち分取試料、例えば牛乳試料の種々のアリコート中の種々の抗生物質を分析するのに使用できるし、又は多数の異なる試料中の同じ被検体を分析するのに使用できる。この後者の方式は、同じ患者から種々の異なる時間で採取した試料を重要な被検体について分析すべき条件について評価するのに特に有効である。あるいはまた、対照又は対照として1又はそれ以上のアッセイを使用できる。

本発明の多重アッセイ装置は該装置を使用すべきアッセイに応じて試料調製帯域及びクロマトグラフ媒体それぞれを2～12個又はそれ以上含有できる。典型的には、該装置は試料調製帯域及びクロマトグラフ媒体それぞれを2～5個含有する。

多重アッセイ装置の操作の原理は、同じ装置を用いて多重アッセイを行う以外は、厳密には第1図及び第2図に示したアッセイ装置の原理と同じである。

第1図に示す原理と同じ原理を用いる多重アッセイ装置の1つの具体的態様を第3図に示す。

一般に、この装置は、

(1) (a) それぞれの試料調製帯域は補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーを溶解可能

な形で含むものである複数の試料調製帯域、及び

(b) 前記第一の対向させ得る構成部品上の前記複数の試料調製帯域から離して配置された吸収剤であって、その中に流体を吸収するための吸収剤

を含んでなる第一の対向させ得る構成部品、並びに

(2) (a) それぞれの試料調製帯域当たりにつき1つである複数の第一のクロマトグラフ媒体であって、それぞれの第一のクロマトグラフ媒体は第一と第二の端部を有しかつ該媒体上に下記の2つの帯域：

(i) 該第一のクロマトグラフ媒体に結合されている固定化被検体又はその類縁体の第一の帯域と；

(ii) 前記の第一のクロマトグラフ媒体に結合されている第一のメンバーに特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーである固定化分子の第二の帯域と

を含む複数の第一のクロマトグラフ媒体と；

(b) それぞれの試料調製帯域当たりにつき1つである複数の第二のクロマトグラフ媒体であって、それぞれの第二のクロマトグラフ媒体は第一と第二の端部を有しかつ該媒体上に比較帯域を含み、該比較帯域はそれに固定化された既知量の被検体又はその類縁体を含むものである複数の第二のクロマトグラフ媒体と；

(c) それぞれの第二のクロマトグラフ媒体当たりにつき1つである複数の比較標識帯域であって、それぞれの比較標識帯域はその中に被検体又はその類縁体に対する標識された特異結合パートナーを前記第二のクロマトグラフ媒体と操作可能な接触において溶解可能な形で含むものである複数の比較標識帯域とを含んでなる、前記第一の対向させ得る構成部品に螺着し得る第二

の対向させ得る構成部品  
を具備してなるものである。

本発明の多重アッセイ装置のこの態様では、第一の対向させ得る構成部品と第二の対向させ得る構成部品とを、これらが対向していない位置から対向した状態にした場合に、複数の試料調製帯域がそれぞれの第一のクロマトグラフ媒体の第一の端部と操作可能な接触をして、試料と、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーとが、それぞれの第一のクロマトグラフ媒体に加えられ、そして吸着剤がそれぞれの第一のクロマトグラフ媒体の第二の端部及びそれぞれの第二のクロマトグラフ媒体の第二の端部と操作可能な接触をして、流体を第一のクロマトグラフ媒体及び第二のクロマトグラフ媒体を通してそれぞれの第一の端部からそれぞれの第二の端部まで引き寄せる。その結果、装置はそれぞれの第一のクロマトグラフ媒体の検出帯域と、それぞれの第二のクロマトグラフ媒体の比較帯域とにおいて結合された標識の強度を比較することによってそれぞれの第一及び第二のクロマトグラフ媒体における所定量よりも多い量の被検体の存在について検出可能な表示を与える。

装置200 は、蝶番206 で連結されている第一の対向させ得る構成部品202 と第二の対向させ得る構成部品204 とを有する。第一の対向させ得る構成部品202 は、複数の試料調製帯域208 を有する。第一の対向させ得る構成部品202 は、それぞれの試料調製帯域208 から離して該第一の対向させ得る構成部品202 上に配置された複数の吸収剤210 を有する。あるいは、試料同士の間で交差混入（クロスコンタミネーション）がない限りは、単一の吸収剤210 を使用で

きる。

第二の対向させ得る構成部品204 は複数の第一のクロマトグラフ媒体212 を含む。それぞれの第一のクロマトグラフ媒体212 は第一の端部214 と第二の端部216 とを有する。それぞれの第一のクロマトグラフ媒体212 は、固定化された被検体の第一の帯域、すなわち捕集帯域218 と、補助特異結合対の第一のメンバーに特異的親和性をもつ補助特異結合対の第二のメンバーである固定化された分子からなる第二の帯域、すなわち検出帯域220 とを有する。また、第二の対向さ

せ得る構成部品204 は複数の第二のクロマトグラフ媒体222 も含む。それぞれの第二のクロマトグラフ媒体222 は第一の端部224 と第二の端部226 とを有する。第二のクロマトグラフ媒体222 のそれぞれは該媒体上に比較帯域228 を有する。第二の対向させ得る構成部品204 は複数の比較標識帯域230 を有する。第一のクロマトグラフ媒体212 と第二のクロマトグラフ媒体222 はプラスチック製支持体232 で支持し得る。第二の対向させ得る構成部品は、前記の第二の帯域、すなわち捕集帯域220 と、比較帯域228 とを見ることが可能にする1個又はそれ以上の開口部234 を有する。また、このクロマトグラフ装置は、鉤236 及び238 とガスケット240 も有する。それぞれの第一のクロマトグラフ媒体212 は流れ調整指示剤242 を有するのが好ましい。

第2図のアッセイ装置と同じ原理で操作する多重アッセイ装置を第4図に示す。一般に、この装置は、

(1)(a)それぞれの試料調製帯域が

(i) 溶解可能な形の、補助特異結合対の第一のメンバーに結合されかつ標識された被検体用特異結合パートナーと；

(ii) 溶解可能な形の、被検体と実質的に架橋反応しない分子用の標識された特異結合パートナーに共有結合された所定量の被検体又はその類縁体を含むものである複数の試料調製帯域；及び

(b) 前記試料調製帯域から隔離されて配置されている吸収剤とを含んでなる、第一の対向させ得る構成部品、並びに

(2) クロマトグラフ媒体のそれぞれの上に別個に下記の重ならない帯域：

(a) クロマトグラフ媒体に結合された固定化被検体又はその類縁体の第一の、捕集帯域と；

(b) 補助特異結合対第一の成分に特異的親和性をもつ前記補助特異結合対の第二のメンバーであって該クロマトグラフ媒体に結合されている第二の成分である固定化分子を含む第二の、検出帯域と；

(c) クロマトグラフ媒体に結合された被検体又はその類縁体に共有結合されている標識された特異結合パートナーに特異的に結合され得る固定

化分子を含む第三の、対照帯域と

を含む、第一と第二の端部を有する複数のクロマトグラフ媒体を含んでなる、第二の対向させ得る構成得品

を具備してなるものである。

本発明のアッセイ装置のこの態様においては、第一の対向させ得る構成部品と第二の対向させ得る構成部品は、第一の対向させ得る構成部品と第二の対向させ得る構成部品とをこれらが対向していない位置から対向した状態にした場合に、前記吸収剤がそれぞれのクロマトグラフ媒体の第二の端部と操作可能な接触をできるように配置される。また、これにより前記複数の試料調製帯域がそれぞれのク

ロマトグラフ媒体の第一端部と接触して、試験試料と、補助特異結合対の第一のメンバーに結合された被検体用の溶解され標識された特異結合パートナーと、標識された特異結合パートナーに共有結合している所定量の被検体又はその類縁体とが、それぞれのクロマトグラフ媒体の第一の端部から第二の端部に流れる。

装置300 は、蝶番306 で連結されている第一の対向させ得る構成部品302 と、第二の対向させ得る構成部品304 とを有する。第一の対向させ得る構成部品302 は、複数の試料調製帯域308 と、それぞれの試料調製帯域308 から離して配置された複数の吸収剤310 とを有する。

第二の対向させ得る構成部品304 は複数のクロマトグラフ媒体312 を含む。それぞれのクロマトグラフ媒体312 は第一の端部314 と第二の端部316 とを有する。クロマトグラフ媒体312 のそれぞれは、第一の帯域、すなわち捕集帯域318 と、第二の帯域、すなわち検出帯域320 と、第三の帯域、すなわち対照帯域322 とを有する。クロマトグラフ媒体312 のそれぞれはプラスチック製支持体324 で支持し得る。第二の対向させ得る構成部品304 は、検出帯域320 と、対照帯域322 とを見ること可能にする複数の開口部326 を有する。第一の対向させ得る構成部品302 と第二の対向させ得る構成部品304 とは、噛み合わせ、例えば鉤328 及び330 によって一緒に保持され、また流体の漏出を防止するためにガスケット332 で包囲される。

使用の際には、前記多重アッセイ装置は第1図及び第2図に示されるような単



一のアッセイを行うアッセイ装置と同じように使用でき、装置上の試薬の溶解とクロマトグラフ媒体中の移動とを可能に

させるのに十分な時間を可能にする。

## II. 被検体及び特異結合パートナー

### A. 被検体

典型的には、本発明のアッセイ装置で行われるような競合アッセイは1価の被検体について使用される。1価の被検体は、典型的にはハプテンであるが、同じ原理は1価である被検体、例えば付加的抗体-結合部位が保護されるか又は修飾されている標準的な多価抗原をアッセイするのに使用できる。

アッセイ可能な被検体としては、下記の化合物：すなわち、テオフィリン；ジゴキシン；ジソピラミド(disopyramide)；リドカイン；プロカインアミド；プロプラノロール；キニジン；アミカシン；ペニシリン及び他の $\beta$ -ラクタム系抗生物質、例えばアンピシリン、アンピシリン誘導体、合成及び半合成ペニシリン類並びにセファロsporin類；ゲンタマイシン；カナマイシン；ネチルマイシン；トブラマイシン；テオラサイクリン；スルホンアミド類、例えばフタルルスルファチアゾール、スルファメチゾール、スルフィソキサゾール、スルファメタジン、スルフィソミジン、アセトスルファミン、スルファニルアミド、スルファフェナゾール、スルファメトキサゾール、スルファジアジン、スルファメトキシジアジン、スルファメトキシピリダジン、スルファジメトキシ、スルファメトキシピラジン、スルファドキシ及び4,4'-ジアミノジフェニルスルホン；三環式抗鬱剤；エトスキシミド(ethosuximide)；フェノバルビタール；ジアゼパム；フェニトイン；プリミドン；バルプロイック

酸；アセトアミノフェノン；アセチルサリチル酸；イブプロフェン；メトトレキサート；乱用薬物、例えばモルヒネ、コデイン、コカイン、フェンタニル、3-メチルフェンタニル、アンフェタミン、リゼリギ酸ジエチルアミド、フェンシクリジン、N,  $\alpha$ -ジメチル-1,3-ベンゾジオキシル-5-エタンアミン（“エクスタシー”）及びヘロイン並びにこれらの代謝物；DNP；1-置換-4-ヒドロキシ-2-ニ

トロベンゼン類；4-置換-2-ニトロ-トリアルキルアニリニウム塩；並びに環境汚染物質、例えばベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、クロルデン、DDT及びその代謝物、2,4-D, 2,4,5-T及びアトラジンが挙げられる。

これらの被検体のうち、特に重要な被検体は $\beta$ -ラクタム系抗生物質、スルファメタジン、ゲンタマイシン及びテトラサイクリンである。これらの抗生物質は牛乳の中に存在する場合があります、牛乳中のこれらの存在を迅速に検出する方法を有するのが望ましい。

#### B. 特異結合パートナー

本発明の装置を使用してアッセイを行うのに適した特異結合パートナーとしては、抗体及び特異結合性タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。特異結合性タンパク質の具体例は、バシラス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) から単離されたペニシリン結合性タンパク質 (PBP) である。特異結合性タンパク質の別の具体例は、ホルモンのタンパク質レセプターである。

典型的には、ハプテンに対する抗体は、抗体産生動物、一般的にはヤギ、ウサギ、ウシ、ウマ又はヒツジのような哺乳動物を、担体

タンパク質に共有結合させたハプテンを用いて免疫化することによって産生される。抗体産生用の担体タンパク質にハプテンを結合させることが、一般的には好ましく、ある場合には必要とし得る。これは大部分のハプテンは、結合させずに抗体産生動物に注射した場合には、極めて弱い免疫原性であるからである。

種々の担体タンパク質が当該技術において周知であり、種々の種の血清アルブミン、キーホールアオガイ (keyhole limpet) ヘモシアニン、チログロブリン、オボアルブミン、フィブリノーゲン、ポリリシン及びツベルクリンの精製タンパク質誘導体 (PPD) を挙げることができる。

多数の連結試薬が当該技術において知られている。ハプテンとタンパク質の結合に使用される種々の反応の中に、アシル化試薬、アルキル化試薬、酸化還元試薬及び親電子試薬がある。

反応の選択は、典型的には反応用ハプテンに利用し得る種々の基に左右される

。ハブテンが遊離カルボキシル基か又は容易にカルボキシル化し得る基を有する場合には、広く使用される方法としては、混成無水物法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド又は1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドのようなカルボジイミドを使用するカルボジイミド法、及びカルボジイミドをN-ヒドロキシコハク酸イミドでエステル化するN-ヒドロキシコハク酸イミドエステル法が挙げられる。

。アミノ基又はアミノ基に還元し得るニトロ基をもつハブテンは多数の反応を介してタンパク質に連結できる。前記アミンが芳香族アミンである場合には、これらのアミンは硝酸を徐々に加えることに

よってジアゾニウム塩に転化させ、次いで穏やかなアルカリ性pHでタンパク質と反応させ得る。脂肪族アミンをもつハブテンは種々の方法、例えばカルボジイミド、トリレン-2,4-ジイソシアネートを使用して又はマレイミド化合物又は過ヨウ素酸ナトリウムを用いる反応を使用してタンパク質に連結できる。別のアプローチは脂肪族アミンをp-ニトロベンゾイルクロリドと反応させ、次いでp-アミノベンゾイルアミドに還元することによって芳香族アミンに転化させるものであり、p-アミノベンゾイルアミドは次いでジアゾ化によりタンパク質に連結できる。

アミノ基と反応してアミジンを生成する二官能性イミデートエステルはハブテンとタンパク質を結合させるのに使用できる。かかるイミデートエステルとしては、ジメチルアジピン酸イミドエステル、ジメチルピメリン酸イミドエステル、ジメチルスベライン酸イミドエステル及び他の同様の類縁体が挙げられる。

スルフヒドリル基をもつハブテンはマレイミドを用いてタンパク質に結合できる。他の反応、例えばプロモアセトアミド基を用いるタンパク質の活性化又は酢酸塩緩衝液、pH4.0 中で担体とタンパク質との間のジスルフィド結合の形成が可能である。

水酸基をもつハブテンについては、その水酸基を別の基に転化させることが一般的に好ましい。例えば、アルコールはコハク酸の半エステルに転化させ得る。該コハク酸の半エステルは結合に利用し得るカルボキシル基を導入する。二官能

性試薬であるセバコイルジクロリドはアルコールを酸塩化物に転化させる。この酸塩化物は弱いアルカリ性pHでタンパク質と容易に反応する。フェノールは、カルボキシル基を導入するジアゾ化p-アミノ安息香酸（これはカルボ

キシル基を導入する）を用いて活性化させることができ、次いで前記の混成酸無水物反応によって担体と反応させ得る。糖類は、p-ニトロフェニルグリコシドの形成、次いで芳香族アミンの場合のようにニトロ基のアミノ基への還元及びジアゾ化の後の結合によって活性化させ得る。別の方法は糖の近接グリコールのアルデヒドへの開裂に基づくものであり、次いでアルデヒドは還元アルキル化によってアミンに連結される。また、ハプテンは、等モル量のホスゲンを用いて調製したクロロカルボン酸エステルを用いて結合し得る。

アルデヒド基又はケトン基をもつハプテンに関しては、カルボキシル基はO-(カルボキシメチル)オキシムの形成を介して容易に導入し得る。また、ケトン基はp-ヒドラジノ安息香酸を用いて誘導してカルボキシル基を生成させ得る。カルボキシル基はカルボキシル基に関して前述したような担体に結合させ得る。アルデヒドを有するハプテンは、水素化ほう素ナトリウムを用いる還元によって安定化されるシッフ塩基の形成を介して直接に結合させ得る。

結合方法は、P. Tijssen著、“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays（酵素イムノアッセイの実際と理論）”（Elsevier, Amsterdam, 1985 年発行）、第12章、第279-296 頁に一般的に記載されている。他の結合方法は当該技術において公知であり、個々のハプテンに使用できる。

### III. 試験用キット

本発明の別の要旨は本発明のアッセイ装置を使用してアッセイを行うための試験用キットである。前記試験用キットは、2種類のクロマトグラフ媒体を用いて、前記のI(B)(1)に記載の態様のアッセイ装置を組み込んだる。

本発明の試験用キットは、

- (1) 前記イムノアッセイ装置と；
- (2) 比較標識帯域中で被検体又はその類縁体に対する標識された特異結合パート

ナーを可溶化させるための液体とを含みうる。

前記液体は典型的には水性液である。水性液は典型的には水、塩水又は緩衝化溶液であるが、他の水性液を使用できる。前記の試験用キットのイムノアッセイ装置は、単一のアッセイを行うアッセイ装置又は多重アッセイ装置のいずれかであり得る。イムノアッセイ装置が多重アッセイ装置である場合には、キットは典型的にはそれぞれの比較標識帯域中の被検体又はその類縁体に対する標識された特異結合パートナーを可溶化させるのに十分な液体を含む。

また、本発明のキットは他の試薬、例えば試料を抽出又は処理するための試薬も含有し得る。

### 例

本発明を以下の例により例証する。これらの例は例示を目的とするだけのものであり、ある意味で本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

### 例1

#### 牛乳中の $\beta$ -ラクタム系抗生物質を検出するための

#### アッセイ装置

#### [有望な例]

本例に記載のアッセイ装置は牛乳中の $\beta$ -ラクタム系抗生物質（ペニシリン類、アンピシリン又はセファロスポリン類）を検出するためのものである。該アッセイ装置はさらに他のアッセイにも使用できる。

この装置は第1図に従って構成される。第一の対向させ得る構成部品10と第二の対向させ得る構成部品12は固体状漂白亜硫酸塩である。第一の対向させ得る構成部品12は、サイトステップ（Cytostep）（Ahlstrom Filtration 社（ペンシルバニア州Hooly Springs 所在）製）の試料調製帯域18を含有する。試料調製帯域はビオチンに結合されたかつコロイド状の金で標識されたペニシリン結合性タンパク質を含む。試料調製帯域18はさらにヒツジ又はヤギのような動物由来の10%抗-ウサギ免疫グロブリンGを含む。ビオチン-標識されたペニシリン結合性タンパク質と、抗-ウサギ免疫グロブリンGは、同じ容量の複合体希釈液（5mMホ

ウ酸塩、0.1 %Triton X-100、1 %ウシ血清アルブミン、5 %スクロース、pH8。  
0) と別々に混合し、37℃で30分間乾燥する。

第二の対向させ得る構成部品14は、20  $\mu$  Mのニトロセルロース (Schleicher & Schuell社 (ニューハンプシャー州キーン所在)) からなる第一のクロマトグラフ媒体22を含む。第一のクロマトグラフ媒体22はその上の第一の帯域28に、ヤギ免疫グロブリンGに結合さ

れかつ前記のように複合体希釈液から第一のクロマトグラフ媒体上で乾燥させた7-アミノセファロスポラン酸を結合している。典型的には、前記第一のクロマトグラフ媒体はその長さが約0.5 インチ〜約1 インチ、その幅が約0.125 インチ〜約0.375 インチの寸法をもつ。また、前記第一のクロマトグラフ媒体は該第一のクロマトグラフ媒体22に結合されたストレプトタビジンからなる第二の帯域30も有する。ストレプトタビジンは複合体希釈液に溶解され、前記のようにして乾燥される。第一のクロマトグラフ媒体22はさらに流れ調節指示剤52を含む。流れ調節指示剤52は複合体緩衝液に溶解されかつ乾燥されたウサギ免疫グロブリンGである。第一のクロマトグラフ媒体22はポリカーボネート試験片支持体(Lexan)42 によって支持される。

また、第一のクロマトグラフ媒体22は流れ調節指示剤52も含む。流れ調節指示剤52は前記のようにして複合体希釈液から乾燥されたウサギ免疫グロブリンGである。第二のクロマトグラフ媒体32は20ミクロンのニトロセルロース (Schleicher & Schuell 社) 製である。第二のクロマトグラフ媒体の寸法は典型的には第一のクロマトグラフ媒体の寸法と同じである。第二のクロマトグラフ媒体32は、その上にタンパク質担体、例えばキーホールアオガイ (keyhole limpet) ヘモシアニン(KLH)を介してクロマトグラフ媒体上に固定化された5 ngのペニシリンGを含む。第二のクロマトグラフ媒体32はさらに比較標識帯域40として金で標識されたペニシリン結合性タンパク質を含む。

使用の際には、未殺菌牛乳を試料調製帯域18に加える。第一の対向させ得る構成成分12はインキュベーターに入れ得る。インキュベ

ーション工程の後に、試薬 A (0.005M リン酸緩衝塩溶液、0.4 %Tween 20、1.25 mM HEPES、0.0025%Triton X-100、0.0015%EDTA、0.25%アジ化ナトリウム、pH 7.5) 2 滴を第二の対向させ得る構成部品32上の比較標識帯域40に加える。次いで、装置を閉じ、結果を読み取る。試験系が対照系よりも表示信号が弱い場合には、前記の牛乳試料はペニシリン G を 5 ng よりも少ないか又はそれと等しい量で含有している。反対に、試験系が対照系よりも表示信号が強い場合には、前記の牛乳試料はペニシリン G を 5 ng を越えて含有している。流れが適切に生じているという条件で、色が常に流れ調整領域で現れる。

### 例 2

#### 牛乳中のゲンタマイシン、スルファメタジン又は テトラサイクリンを検出するための試験装置

(有望な例)

牛乳中の抗生物質ゲンタマイシン、スルファメタジン又はテトラサイクリンのうちの一つを検出するための装置を、第一の対向させ得る構成部品12の試料調製帯域18上のビオチンに結合されかつコロイド状の金で標識されたペニシリン結合性タンパク質を、ビオチンに結合されかつコロイド状の金で標識された抗生物質用モノクローナル抗体に置き換えた以外は、例 1 に従って構成する。同様に、比較標識帯域はコロイド状の金で標識された上記と同じ抗生物質用モノクローナル抗体である。第一のクロマトグラフ媒体22に結合されている固定化された被検体又はその類縁体からなる前記第一の帯域

28は、免疫グロブリン G 種に共有結合された抗原であって、抗-ウサギ免疫グロブリン G 抗体によって特異的に結合されない抗原である。対照系は第二のクロマトグラフ媒体32上に固定化された前記抗原 5 ng 又はそれと等しい量である。

構成についてのその他の詳細及びアッセイの実施は例 1 に記載の通りである。

### 例 3

#### 牛乳中の $\beta$ -ラクタム系抗生物質を検出するための 試験装置 (別の構成)

(有望な例)

牛乳中の $\beta$ -ラクタム系抗生物質を検出するための試験装置は第2図の別の方式で構成し得る。この装置は第2図に従って構成し得る。第一の対向させ得る構成部品102と第二の対向させ得る構成部品104は固体状漂白亜硫酸塩である。試料調製帯域108は、抗-ウサギ免疫グロブリンGを介してコロイド状の金に結合されたペニシリンGを5ng/ml(又は等量)含む。試料調製帯域108はまコロイド状の金で標識されたビオチン-標識されたペニシリン結合性タンパク質も含む。これらの試薬は、前記のサイトステップ(Ahlstrom社)である試料調製帯域上で乾燥される。吸収剤110はアールストロム(Ahlstrom)270である。

第二の対向させ得る構成部品104は、20ミクロンのニトロセルロース(Schleicher & Schuell社)であるクロマトグラフ媒体112を有する。クロマトグラフ媒体112はレグザン支持体(Lexan backing

)で支持される。クロマトグラフ媒体112はその上に(1)ヤギ免疫グロブリンGに結合されかつ該クロマトグラフ媒体に固定された7-アミノセファロスポラン酸からなる第一の捕集帯域118と；(2)例1に記載のようなストレプトビジンからなる検出帯域120と；(3)対照帯域122であって、流れ調節指示剤としても機能しかつ固定化ウサギ免疫グロブリンGである対照帯域122とを含む。使用の際には、未殺菌牛乳を試料調整帯域108に加え、該試験カードを例1のようにインキュベーターに入れる。次いで、装置を閉じ、結果を読み取る。試験系が対照系よりも表示信号が弱い場合には、前記の牛乳試料はペニシリンGを5ngよりも少ないか又はそれと等しい量で含有している。反対に、試験系が対照系よりも表示信号が強い場合には、前記の牛乳試料はペニシリンGを5ngを越えて含有している。いずれの場合にも、対照系(これは流れ調節指示剤としても機能する)は検出可能な信号を与えるべきものである。

#### 例4

牛乳中のゲンタマイシン、スルファメタジン又は  
テトラサイクリンを検出するためのアッセイ装置

(別の構成)

(有望な例)



牛乳中の抗生物質ゲンタマイシン、スルファメタジン又はテトラサイクリンを検出するための装置であって別の構成の装置は、第一の対向させ得る構成部品102上の試料調製帯域108が、コロイド状の金に5ng（又は等量）有しかつコロイド状の金で標識されかつビ

オチンに結合されているモノクローナル抗体-抗原（例2参照）を有する以外は、例1に従って構成される。

クロマトグラフ媒体112上の捕集帯域118はヤギ免疫グロブリンGに共有結合された抗原である。構成についてのその他の詳細及び実アッセイの実施は例3に記載の通りである。

#### 発明の利点

本発明のクロマトグラフアッセイ装置は、種々さまざまな抗原及びハブテンについて、アッセイの正確な実施について陽性表示を与えながら半定量的アッセイを行うことができる。

また、本発明のクロマトグラフアッセイ装置は、対向させ得る構成部品から構成されるものであるという利点を提供する。対向させ得る構成部品を使用すると、多数の種々の順序で反応の遂行を可能にするという理由から、優れた多用性を提供する。これは、かかる対向させ得る構成部品を使用すると試験片の正確に定められた領域への試薬の送達又は他の反応成分の送達可能にすることから可能である。また、対向させ得る構成部品を使用すると、試薬が装置の無意味な容量中で隔離されることによって浪費されないことを確実にすることによって最小限の試薬使用量で最適な実施が提供される。さらにまた、対向させ得る構成部品を使用すると、汚染されていると思われる血液試料であって、それぞれがHIV又は肝炎ウイルスを含有するような血液試料の最適な混入汚染が提供される。

手で直接閉じることによって対向した状態に失得る対向させ得る構成部品を使用すると、オペレーターが追加量の液体又は壊れ易いカプセルを使用することなく本発明に従ってアッセイを行うことが

可能になる。これは、1種類の試料又は複数の試料をクロマトグラフ媒体に加え

ると、追加量の液体を加えることなくアッセイを行うことを可能にし、希釈を回避しかつ本発明のアッセイ装置を用いて行われるアッセイの感度を保持する。

さらにまた、本発明のクロマトグラフアッセイ装置は、臨床上重要な被検体の迅速かつ正確な検出を可能にする。前記装置の構成は、クロマトグラフ媒体に使用を加えることも可能し、かつ粒状物又は着色試料によって誘導され得る妨害物を減少させる。可溶化し得る形でコロイド状金属標識を使用すると、標識化において極めて迅速な速度を与えかつアッセイノ性能を向上させる。

本発明の装置を使用する方法は、幅広い動的範囲を有し、しかも被検体の高い濃度において他の試験方法で生じ得る間違った陰性結果が実質的にない。

本発明はかなり詳細に説明されているが、ある種のその好ましい変形及び態様を参照して、他の変形及び態様が可能である。これらの変形及び態様は本明細書に記載の基本的原理によって操作しかつ競合イムノアッセイを行う2つ構成部品からなる装置の他の構成を包含する。従って、本発明の範囲は以下の請求の範囲によって決定される。

【図1】

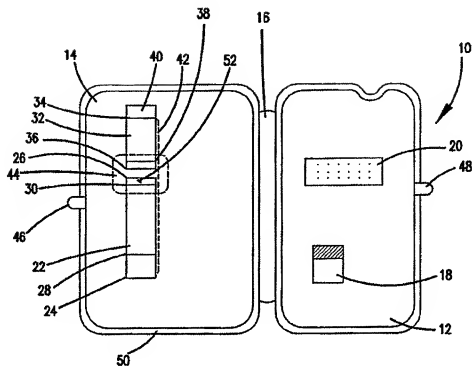


FIG. 1

【図2】

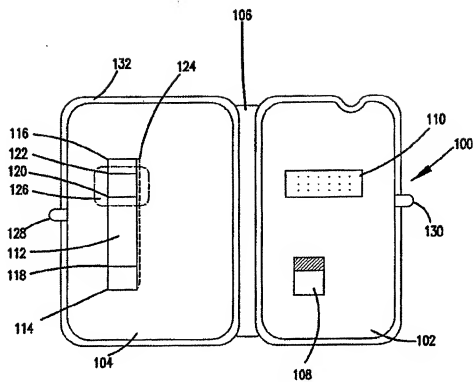


FIG. 2

【図3】

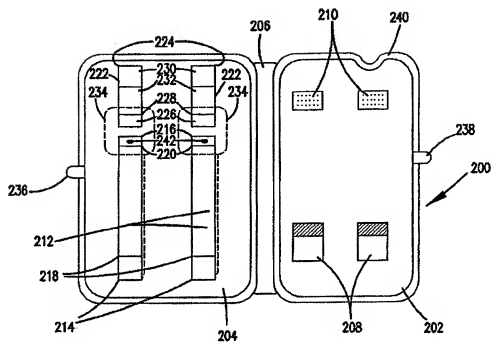


FIG. 3

【図4】

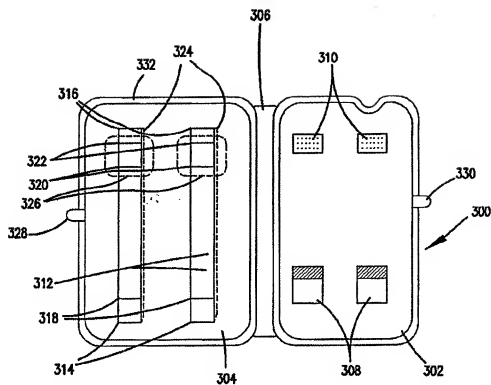


FIG. 4

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US96/07576

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : Please See Extra Sheet.

US CL : Please See Extra Sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : Please See Extra Sheet.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

AFS, STN

search terms: immunoassays, calibration, avidin, biotin, chromatography, immobilized

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,395,754 A (LAMBOTTE ET AL) 07 March 1995, see entire document, especially column 1, lines 49-53, column 4, lines 12-31.	1-18
A,P	US 5,424,220 A (GOERLACH-GRAW ET AL) 13 June 1995, see entire document.	1-18
A	WILCHEK et al. The avidin-biotin complex in immunology. Immunology Today. 1984, Vol. 5, No. 2, pages 39-43.	13, 14, 17, 18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the current state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as qualified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an improvement when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 JULY 1996

Date of mailing of the international search report

18 SEP 1996

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

BAO-THUY L. NGUYEN

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US96/07576

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC (0):

G01N 21/00, 21/77, 15/06, 31/22, 33/00, 33/48, 30/02, 33/53, 33/552, 33/537, 33/554; C12M 1/00

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

422/56, 58, 61, 59, 68.1, 70; 435/7.1, 7.9, 7.92, 7.93, 7.95, 287.1, 287.2, 287.3, 287.4, 287.5, 287.6, 287.7, 287.8, 287.9, 810, 975; 436/514, 518, 527, 538, 169, 805, 806, 810

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched

Classification System: U.S.

422/56, 58, 61, 59, 68.1, 70; 435/7.1, 7.9, 7.92, 7.93, 7.95, 287.1, 287.2, 287.3, 287.4, 287.5, 287.6, 287.7, 287.8, 287.9, 810, 975; 436/514, 518, 527, 538, 169, 805, 806, 810